

局所投与したアクチビンAの移植骨形成促進作用

著者	廣谷 拓章
雑誌名	東北大学歯学雑誌
巻	17
号	1
ページ	34-51
発行年	1998-06
URL	http://hdl.handle.net/10097/31620

原 著

局所投与したアクチビン A の移植骨形成促進作用

廣 谷 拓 章

東北大学歯学部口腔外科学第二講座

(指導: 手島貞一名誉教授)

(兼担主任: 鹿沼晶夫教授)

東北大学歯学部歯科薬理学講座

(指導: 篠田 壽教授)

(平成9年11月27日受付, 平成9年12月6日受理)

Effect of topical administration of activin A on the formation of isografted bone

Hiroaki Hirotani

Department of Oral and Maxillofacial Surgery II,

(Director: Emeritus Prof. Teiichi Teshima),

(Chief: Prof. Akio Kanuma),

Department of Pharmacology,

(Director: Prof. Hisashi Shinoda),

Tohoku University School of Dentistry

Abstract: Activin A, a member of the transforming growth factor- β superfamily, is abundantly present in bone matrix, but little is known about its physiological role in bone metabolism. The present study was undertaken to determine whether topical activin A can increase the bone mass of isografted bone. The tibiae were bilaterally dissected from a donor C3H/HeJ- $+/+$ mouse and transplanted subcutaneously in the dorsal region of a recipient mouse of the same strain. One isografted tibia was topically infused for either 1, 2, 3, or 4 weeks with activin A, administered with an osmotic minipump at a dose of either 0.02, 0.2, or 2 ng/hr. The other tibia was infused with 0.9% NaCl and served as control. The following results were obtained:

1) Topical activin A (2 ng/hr) markedly stimulated periosteal bone formation after 2 or 3 weeks, especially on the lateral and posterior sides. The thickness of the cortical bone on these sides was 1.4 to 1.5 fold that of control. Newly formed bone was also found in the marrow after 4 weeks.

2) Numerous cuboidal or conical osteoblasts appeared on the surface of newly formed bone after the infusion of activin A for 2 or 3 weeks. In addition, autoradiographic studies using ^3H -proline revealed that the number of silver grains in the bone matrix under the active osteoblasts was larger in the activin A-treated bone than control, suggesting increased synthesis and secretion of collagen by osteoblasts.

3) Topical activin A increased the number of osteoclasts after 2 to 4 weeks. Furthermore, marked bone resorption was observed in the projected anterior site of activin A-treated bone after 4 weeks.

The above results suggest that topical activin A increases the bone mass of isografted bone by increasing bone turnover.

Key words: activin A, isografted bone, bone mass, bone turnover

緒 言

口腔外科領域においては、大きな顎嚢胞や腫瘍などの摘出後、あるいは外傷等によって生じた骨欠損の修復や先天的な顎裂部の閉鎖等の目的で、自家骨移植¹⁾が行われる事がある。顎裂部における自家骨移植^{2,3)}などでは、骨移植部に歯を移動したり、顎裂に隣在する歯の支持骨を増やし長期にわたって歯を機能させる必要から、骨欠損部における良好な骨架橋の形成⁴⁻⁶⁾が望まれる。このような骨移植部位においては、単に移植骨が生着すればよいというだけでは十分とはいええず、吸収、置換された新生骨が安定した代謝を営み、その高さや幅などが長期にわたって一定以上に保持されることが望ましい。その為、移植骨組織における骨代謝を活性化し、積極的に骨形成の促進をはかるような取り組みが求められ、近年、骨形成に関与する因子についての様々な研究が行われている。

アクチビン^{7,8)}は卵胞液中から発見された分子量約25000の蛋白質で、脳下垂体前葉からの卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone: FSH) の分泌を促進する因子として見いだされた。アクチビンはその一次構造から形質転換成長因子 (transforming growth factor- β : TGF- β) スーパーファミリーに分類され、骨形成蛋白質 (bone morphogenetic proteins: BMPs)^{9,10)} や TGF- β ^{11,12)} と同様、骨基質中にも豊富に存在する事¹³⁾ が最近明らかにされている。アクチビンは βA サブユニットと βB サブユニットのダイマーという構造を持ち、その組み合わせから、 βA のホモダイマー (アクチビン A)、 βB のホモダイマー (アクチビン B)、 βA 、 βB のヘテロダイマー (アクチビン AB) の3種類が存在する。これらの中で、アクチビン A はフレンド細胞をヘモグロビン産生細胞に分化させる因子として発見された赤芽球分化促進因子 (erythroid differentiation factor: EDF)¹⁴⁾ と同一の物質であることが確認され¹⁵⁾、下垂体以外にも卵巣や睾丸、胎盤や骨髄、副腎、脾臓、脳など広く全身に分布していること¹⁶⁾ が知られている。アクチビン A は造血系における赤芽球の分化誘導だけでなく、単球/マクロファージ系細胞の分化誘導作用¹⁷⁾ もあることが報告されており、神経細胞に対して栄養因子¹⁸⁾ や増殖因子¹⁹⁾ として働くことや、両生類の初期発生における中胚葉誘導作用²⁰⁻²²⁾ を有することなども明らかにされ、ホルモン様

の調節因子というよりも、細胞分化の調節因子として重要であると認識されるようになっている。

最近、アクチビン A は骨芽細胞にその結合部位が存在する²³⁾ ことが明らかにされ、骨芽細胞様細胞の培養系において DNA 合成やコラーゲン合成を促進すること^{23,24)} や、骨髄細胞の培養や骨器官培養系で破骨細胞の形成を促進する²⁵⁾ ことなどが報告されている。また、ラットを用いた研究では局所における骨形成の促進作用²⁶⁾ が報告されており、アクチビン A が骨形成系と骨吸収系において促進的に働く可能性が示唆されている。

本研究ではこれらの点をふまえ、個体間の骨移植においても移植免疫学的拒絶反応が起こらず、自家骨移植と同じ状態を得ることが出来る同系骨移植が可能な近交系マウスを用い、皮下へ移植した脛骨片に持続的にアクチビン A の局所投与を行い、移植骨組織における骨代謝に関して、アクチビン A が骨形成促進的に働く可能性があるか否かについて検討を行った。

材料および方法

1. 骨移植の実施法

1) 実験動物

Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, U.S.A.) 由来の C3H/HeJ- α/α (C3H/ α) マウス (♂) を総計 101 匹用いた。C3H/ α マウスは 20 代以上兄妹交配を行った近交系マウスであり、遺伝的にほぼ同一な個体群で、組織適合抗原が同一であるため、個体間で骨移植を行った場合でも移植片と宿主間の免疫応答は起こらず、自家骨移植と同じ状態を得ることが出来る。実験期間中は室温 $24 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の明暗サイクルのもと、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育し、固形飼料 F-1 (船橋農場) と脱イオン水を自由に摂取させた。

2) 移植骨の調整と骨移植

10 週齢の C3H/ α マウス (♂) 同士での同系骨移植を行った。骨供与マウスをエーテルで屠殺し、両側の脛骨を摘出、骨膜を触らぬように筋肉を可及的に除去した。これらの脛骨を滅菌処理した 4°C の 0.01M 磷酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffer Saline: PBS) に浸漬し、遠心端は腓骨の停止部で、近心端は骨端からおおよそ 2mm の部位でエンジンを用いて切断した。

なお、脛骨の切断の際には滅菌ダイヤモンドホイールを用い、熱を持たぬようにエンジンは低回転で使用した。調整した左右の移植脛骨片は、ペントバルビタール麻酔下に別のマウス（骨受容マウス）の左右の側背部皮下に移植し、以下の方法により一方の移植骨にはアクチビン A を、反対側の移植骨（対照骨）には生理食塩水を、オスモティックミニポンプを用いて投与した。骨移植後は切開部の皮膚を縫合し、ペニシリンを 1000 単位投与した。すべての術式は滅菌処理下、無菌的に行った。

3) オスモティックミニポンプによる移植骨へのアクチビン A 局所投与

各用量のアクチビン A、あるいは対照骨用の生理食塩水を注入した滅菌オスモティックミニポンプ (Model 2002, Alza Co., U.S.A.) に、先に 27G の滅菌ステンレスパイプをつけた長さ 6cm の滅菌ポリエチレンチューブ (PE60, Becton Dickinson Co., U.S.A.) をつなぎ、このステンレスパイプを移植骨である脛骨の遠心端から骨髓腔内に約 1mm 挿入した (図 1)。その際、ポリエチレンチューブを介してオスモティックミニポンプと移植骨は互いに反対側の側背部に位置するようにした (図 2)。

4) アクチビン A の投与量と投与期間

リコンビナント・ヒト・アクチビン A は味の素株式会社、中央研究所より得た。アクチビン A が移植骨に及ぼす用量反応関係をみる目的で、アクチビン A を 0, 0.04, 0.4, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で含み、且つ、アクチビン A のキャリアーとして、C3H/ + マウスから得た血

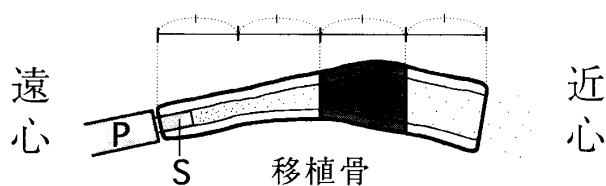


図 1 オスモティックミニポンプを用いた移植骨へのアクチビン A 局所投与

アクチビン A 溶液、あるいは生理食塩水を 200 μl 入れたオスモティックミニポンプに、先に 27G の滅菌ステンレスパイプをつけた長さ 6cm の滅菌ポリエチレンチューブをつなぎ、このステンレスパイプを移植骨である脛骨の遠心端から骨髓腔内に約 1mm 挿入した。アクチビン A 投与骨、対照骨ともに移植骨の長軸の中心から近心 1/4 の部位 (■) を観察の対象とした。

P: ポリエチレンチューブ

S: 27G ステンレスパイプ

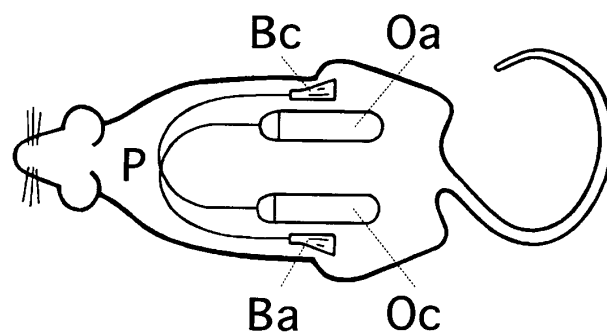


図 2 骨受容マウスの皮下に移植された脛骨とオスモティックミニポンプ

骨受容マウスの側背部皮下にアクチビン A 投与骨と対照骨が互いに反対側に位置するように移植した。オスモティックミニポンプは背部皮下中央付近に填入した。

P: ポリエチレンチューブ

Ba: アクチビン A 投与骨 Bc: 対照骨

Oa: アクチビン A 溶液含有オスモティックミニポンプ

Oc: 0.9%NaCl 溶液含有オスモティックミニポンプ

清を 0.2% の割合で含む滅菌生理食塩水 (0.9% NaCl) を調整した。これらの溶液を 0.5 $\mu\text{l}/\text{hr}$ の流量の滅菌オスモティックミニポンプに注入し、片側の移植脛骨に 2 週間持続的に投与した。この場合、アクチビン A の投与量はそれぞれ 0, 0.02, 0.2, 2 ng/hr であった。同一マウスの反対側に移植した対照骨には、アクチビン A を含まない滅菌生理食塩水 (0.9% NaCl, C3H/ + マウスの血清を 0.2% の割合で含む) を 0.5 $\mu\text{l}/\text{hr}$ の流量で投与した。また、投与期間によってアクチビン A の効果がどのように異なるかをみるため、アクチビン A を 2 ng/hr の用量で与えた群について、その投与期間を 1 週間、2 週間、3 週間、4 週間とした群を作り、あわせて両側の脛骨とも未移植、未投与である群 (0 週間) を作った。なお、モデル 2002 のオスモティックミニポンプは溶液の排出期間が 2 週間のため、投与期間が 3 週間、4 週間の群では、骨移植を行ってから 2 週間目にネンブタール麻酔下にポンプのみを交換し 3 週間、4 週間と持続的に投与した。

2. アクチビン A が移植骨組織の骨代謝に与える効果の評価法

1) 移植骨のマクロ写真像、軟 X 線写真像および組織標本の作製

一定の投与期間後、エーテルで屠殺して摘出した

移植骨はカルノフスキー溶液で固定後、実体顕微鏡を用いてマクロ写真を撮影した。また、あわせて軟 X 線撮影 (SOFTEX Type CMB, ソフテックス社, 東京) を行った。80V, 1mA, 60 秒の条件で移植骨である脛骨の内側面方向から軟 X 線撮影を行い, 20°C で 4 分間現像した。その後, すべての試料は 10% EDTA 溶液で脱灰し通法に従ってパラフィン包埋した後, 目的部位より厚さ 4 μ m の横断切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色, 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRACP) 染色²⁷⁾ を施し, 組織学的な検索を行った。

2) 骨形成量の計測

アクチビン A 投与骨と対照骨とでは, 予備実験において移植骨の長軸的中心から近心 1/4 の部位 (図 1) で添加骨の厚みに最も差がみられたため, この部位を主な検索対象部位として選び, 横断組織標本作製し, 図 3 に示すような 4ヶ所で皮質骨の厚さを測定した。即ち, 骨髓腔の後面壁を基準として, 後面壁の中心から 1/4 外側寄りの点から骨髓腔の前縁壁まで垂線を引き, この線分を 4 等分し, 中心から 1/4 前縁寄りの点でさらに外側に向かって垂線を引いた。この 2 本の垂線上で脛骨の外側部 (以下, 外側 I) と後部 (以下, 後面 I) の骨の厚みを計測した。同様にして骨髓腔の後面壁を基準として後面壁の中心から骨髓腔の前縁壁まで垂線を引き, この線分を 2 等分する点で外側に向かって垂線を引き, この線上でも脛骨の外側部 (以下, 外側 II) と後部 (以下, 後面 II) の骨の厚みを計測した。なお, 図 3 の外側 I, II のように, 計測する線上に骨が散在する場合にはそれらの和をもってその部の骨の厚みとした。また, アクチビン A が骨形成に及ぼす作用を正確に評価するために, 左右の移植骨の同一部位から横断標本作製し, アクチビン A 投与骨の骨の厚みを対照骨の骨の厚みに対する比として求めた。なお, 両側の脛骨にアクチビン A を含まない生理食塩水を 2 週間投与した移植骨間での比較と, 投与期間が両側とも 0 週間 (未移植, 未投与) である脛骨間の比較では, 両側の移植骨ともアクチビン A を投与していないため, 便宜的に左側に対する右側の骨の厚みの比をもって計測値とした。

3) 破骨細胞数の測定

移植骨の骨吸収系におよぼすアクチビン A の効果を検討するために, 骨形成量の計測用に作製した横断組織標本と同一部位における横断組織上で, 骨表面にあり, 核を 3 個以上もつ TRACP 染色陽性の細胞を破

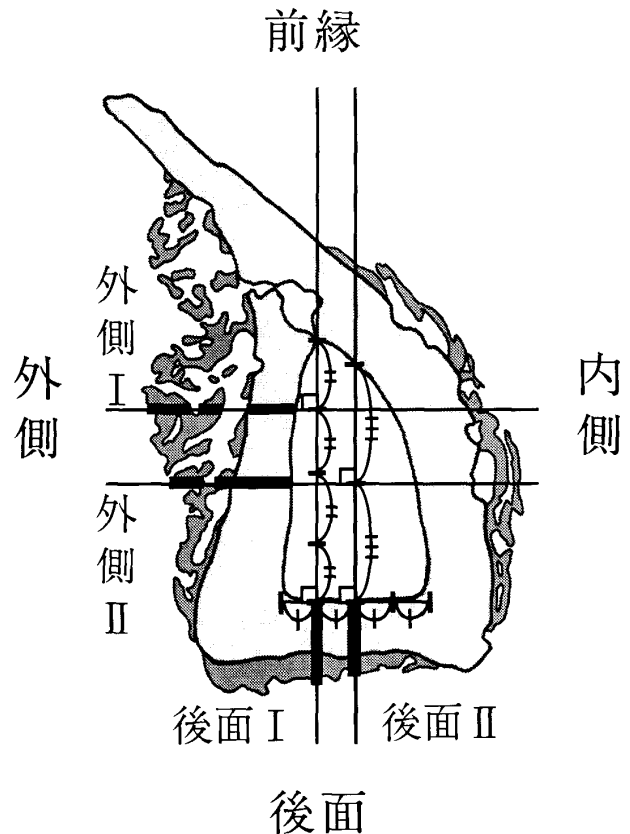


図 3 骨の厚みの計測部位

図の外側 I・II, 後面 I・II の 4ヶ所で骨の厚みを計測した。外側 I・II のように計測する線上に骨が散在する場合にはそれらの和をもってその部の骨の厚みとした。

外側 I: 骨髓腔の後面壁の中心から 1/4 外側寄りの点で垂線を引き, 骨髓腔内における線分の中心から 1/4 前縁寄りの点でさらに垂線を引き, この線上において脛骨外側面の骨の厚みを計測した。
外側 II: 骨髓腔の後面壁の中心で垂線を引き, 骨髓腔内における線分の中心でさらに垂線を引き, この線上において脛骨外側面の骨の厚みを計測した。

後面 I: 骨髓腔の後面壁の中心から 1/4 外側寄りの点で垂線を引き, この線上において脛骨後面の骨の厚みを計測した。

後面 II: 骨髓腔の後面壁の中心で垂線を引き, この線上において脛骨後面の骨の厚みを計測した。

骨細胞と定義し, 外骨膜側の骨表面に存在する破骨細胞数と骨髓腔内に存在する破骨細胞とを各々分けて測定した。なお, 骨形成量の計測の場合と同様, 両側の脛骨にアクチビン A を含まない生理食塩水を 2 週間投与した移植骨での計測と, 投与期間が両側とも 0 週間 (未移植, 未投与) である脛骨の計測では, 両側の

移植骨ともアクチビン A を投与していないので、便宜的に左側の脛骨の破骨細胞数を対照骨の破骨細胞数、右側の脛骨の破骨細胞数をアクチビン A 投与骨の破骨細胞数として扱った。

4) オートラジオグラフによる骨芽細胞のコラーゲン性基質合成・分泌能の解析

骨供与マウスより得た片側の脛骨に 2 ng/hr の用量のアクチビン A を、他側の脛骨に生理食塩水を、3 週間持続的に投与した群の C3H/ + マウス 5 匹に、体重 1 kg あたり 37MBq (1.0mCi) の L- [2,3-³H] プロリン (Amersham, U.K.) を腹腔内投与し、1 時間後にエーテルで屠殺、移植骨を摘出し、カルノフスキー溶液で固定した。10% EDTA 溶液を用いて脱灰後パラフィン包埋し、骨形成量の計測用の組織標本と同様、脛骨の長軸的中心から近心 1/4 の部位にかけての同一部位から厚さ 4 μ m の横断組織標本を作製した。標本上のパラフィンをキシレンにて除去しアルコール下降系列に通した後、2 倍希釈のオートラジオグラフ用感光乳剤 (NR-M2, コニカ, 東京) をディッピング法にて塗布し、4°C にて 6 週間の露光を行った。その後 20°C コニカドール (コニカ, 東京) で 4 分間現像、20°C レンフィックス (富士写真フィルム, 東京) で 4 分間定着処理を行い、ヘマトキシリンにて軽度に染色しオートラジオグラフを得た。その後、オートラジオグラフ標本上で骨表面に配列する骨芽細胞下の骨基質単位面積 (高さ 12 μ m \times 幅 60 μ m = 720 μ m²) 中に存在する感光

銀粒子数を光学顕微鏡 (Axiophoto, Carl Zeiss, Germany) 下で測定し、骨芽細胞のコラーゲン性基質合成・分泌能の指標とした。なお、感光銀粒子数の測定にあたっては各オートラジオグラフ標本上の全エリア中最も活発に基質合成・分泌活動を行っていると考えられる骨芽細胞下の部位上位 8ヶ所を選定、測定し、アクチビン A が骨芽細胞のコラーゲン性基質合成・分泌能に与える影響を検討した。

5) 統計処理

得られたデータは平均値 \pm 標準誤差で表示した。各計測項目ごとに Bartlett test を用いて分散の均一性の検定を行い、分散が均一とみなせない骨の厚みの計測値についてはまず Kruskal-Wallis test を行い、有意差の認められた計測項目について Mann-Whitney test を用いて各群間の有意差の検定を行った。分散が均一とみなせる破骨細胞数の計測値と感光銀粒子数の計測値については Two factor factorial ANOVA を行った。加えて破骨細胞数の計測値については、有意差の認められた計測項目について、交互作用のないことを確認したうえで対応のある t 検定を行い、各群間の有意差の検定を行った。また、分散が均一とみなせる骨の厚みと感光銀粒子数の相関関係についてピアソンの相関係数を求め、相関係数の検定 (Fisher の z 検定) を行った。

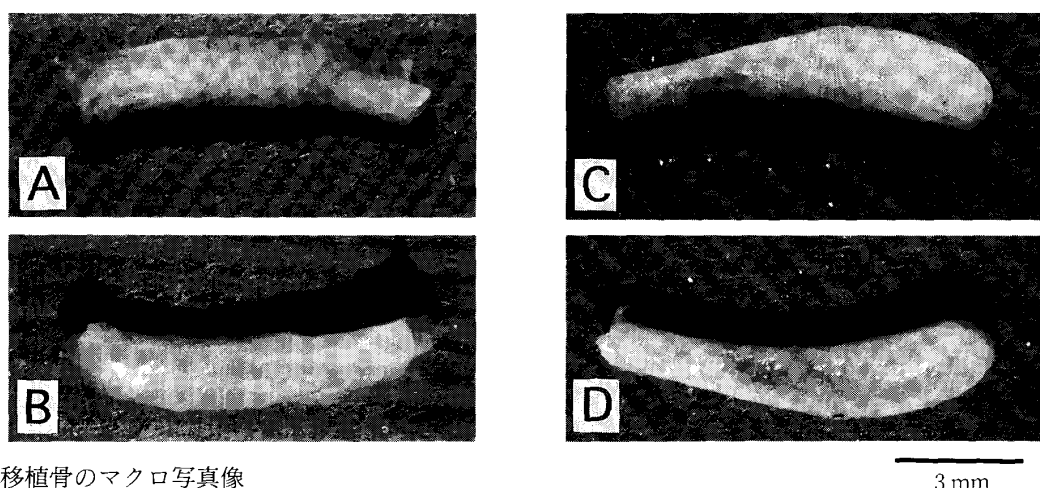


図4 移植骨のマクロ写真像

A,B: アクチビン A 投与骨 (2 ng/hr)

C,D: 対照骨

A, B は 4 週間アクチビン A を投与した脛骨の内側面像と外側面像であり, C, D はその対照骨の内側面像と外側面像である。アクチビン A 投与骨の外側面にはその凹面を埋める形で骨添加が認められ, 典型的な例では骨の全周にわたって不規則な凹凸状の骨添加がみられる (A, B)。

結 果

1. 肉眼的所見および軟 X 線写真像

肉眼的所見：アクチビン A を 2 ng/hr の用量で投与した移植骨では、投与開始後 1 週間までは反対側に移植した対照骨との間に特に差は認められなかった。しかし、移植後 2 ないし 3 週間以降、特に 4 週間経過したアクチビン A 投与骨には外側面と後面を中心に著明な新生骨の添加が認められた。特に外側面においてはその凹面を埋める形で新生骨が添加されており、典型的な例では外側面や後面だけでなく骨の全周にわたって不規則な凹凸状の骨添加が認められた（図 4A, B）。長軸的にはこの骨添加は、中心部付近から近心端にかけて特に顕著であった。3 週、4 週目対照骨の外側面や後面にもわずかな骨添加が認められたが、その程度はアクチビン A 投与群の脛骨と比較して明らかに低かった（図 4C, D）。一方、4 週間のアクチビン A 投

与骨の外形についてみると、骨添加が外側面と後面を中心に起こって内外側方向への骨の厚みが増す一方で、骨前縁部、特に近心端に近いやや突出した前縁部の骨が吸収されているため、長軸方向からみると骨が全体的に丸みを帯びた形になっていることが観察された。対照骨ではこのような変化はほとんどみられなかった。アクチビン A の用量を 0.02 ng/hr, 0.2 ng/hr の割合で 2 週間投与した移植骨では、以上のような所見はみられず、それぞれの対照骨と類似した所見を示した。

軟 X 線写真像：アクチビン A を 2 ng/hr の用量で投与した移植骨では、投与開始後 2 週間までは、対照骨との違いは特にみられなかった。3 週間のアクチビン A 投与骨では長軸的中心から近心にかけての前縁寄りの部分において、対照骨と比較して X 線透過性が低下し、骨密度が上昇している像が認められ、4 週間のアクチビン A 投与骨ではこの X 線透過性の低下はさ

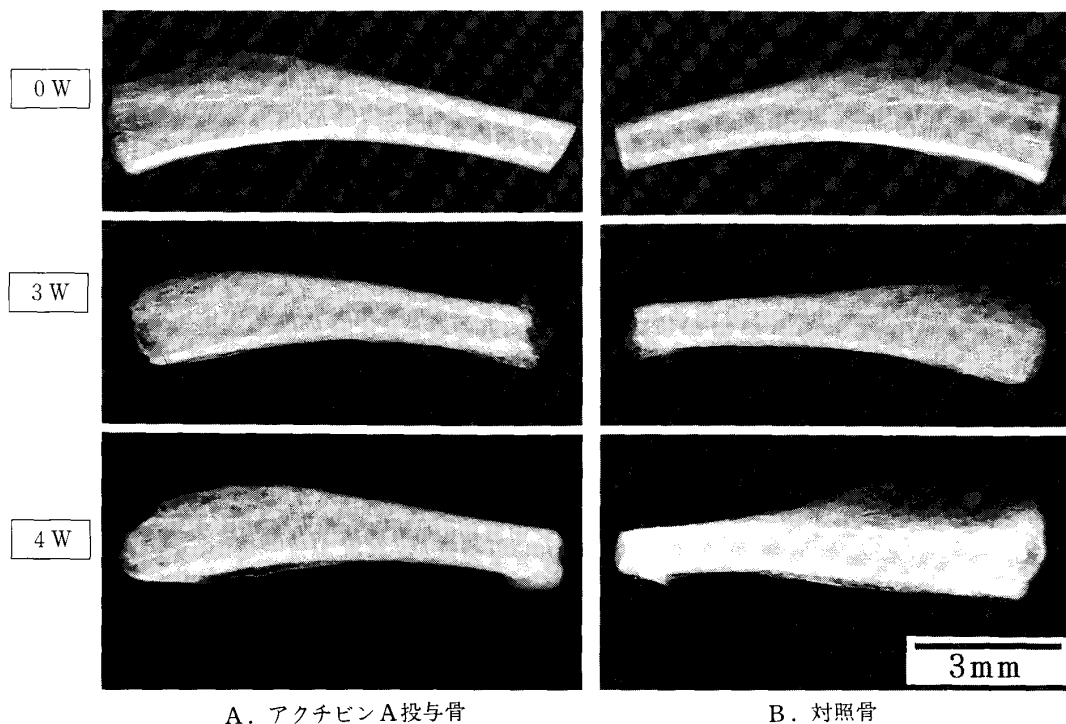


図 5 移植骨の内側面方向から撮影した軟 X 線写真像

アクチビン A 投与 3 週間の骨は対照骨と比較して、長軸的中心から近心にかけての前縁寄りの部分において X 線透過性がやや低下し、骨密度が上昇している。アクチビン A 投与 4 週間の骨では近心寄りの骨前縁部の骨が吸収されてほぼ消失し、骨変化が進行している。

0W：未移植骨

3W：アクチビン A または生理食塩水投与 3 週間

4W：アクチビン A または生理食塩水投与 4 週間

らに明瞭であった(図5)。加えて、本来X線透過性が高い、近心寄りの骨前縁部が3週目以降次第に吸収され、4週目ではこの部位の骨がほぼ消失していた。肉眼的所見と同様、アクチビンA投与4週間の骨では、対照骨と比較して、内外側方向からみて骨の前後径が短くなった像が観察された。アクチビンAを0.02 ng/hr, 0.2 ng/hrの用量で投与した移植骨においては、それぞれの対照骨と比較して、このような違いはみられなかった。

2. 組織学的所見

1 週間投与

アクチビンA投与骨(2 ng/hr)、対照骨ともに脛骨外骨膜側における明瞭な骨組織の形成はみられなかった(図6)。しかしながらアクチビンA投与骨では、外骨膜側に部分的に類骨(osteoid)ないしは線維性骨(woven bone)の形成がみられるものが、6例中2例の標本に認められた。このような類骨の外側は未分化間葉系細胞と思われる比較的扁平な細胞で密に覆われ、添加骨の内側に移行するにつれて、骨芽細胞への分化の途上と思われる不規則な立方形の細胞を多く含んでいるのが観察された(図7)。しかし、典型的な立方形状を示す骨芽細胞が表面に配列した骨はみられず、添加した類骨の表層には破骨細胞もほとんどみられな

かった。一方、対照骨の外骨膜側は、密に配列した未分化間葉系細胞を主体とした膜様組織で部分的に覆われている例は多くみられたが、アクチビンA投与骨にみられたような類骨の形成がみられる例はなかった(6例中0例)。

移植骨の骨髓腔内は、アクチビンA投与骨、対照骨ともに、壊死後の骨髓残渣と疎になったリンパ球が、少量の赤血球と共に認められ、外骨膜側でみられたような類骨組織の新生はみられず、破骨細胞が出現している像もみられなかった。

2・3 週間投与

アクチビンA(2 ng/hr)を投与して2週間の脛骨では対照骨に較べて外骨膜側への新生骨の添加が盛んで、特に外側面と後面において、1週目で部分的に始まっていた線維性骨の著明な形成が認められた。内側面においても骨形成を認める例は多かったが、他の2面に較べてその添加量は少なかった(図8)。こうした網状の線維性骨組織の表面には単層に配列した立方形、円錐形の骨芽細胞が豊富に存在しており、このような骨芽細胞のまわりには盛んな骨の改造機転をうかがわせる破骨細胞と思われる多数のTRACP陽性細胞が出現していた。また、新しく添加された線維性骨の内部には、既存の皮質骨と類似した骨小腔も多数認められた。盛んに形成が行われ、改造機転が働いてい

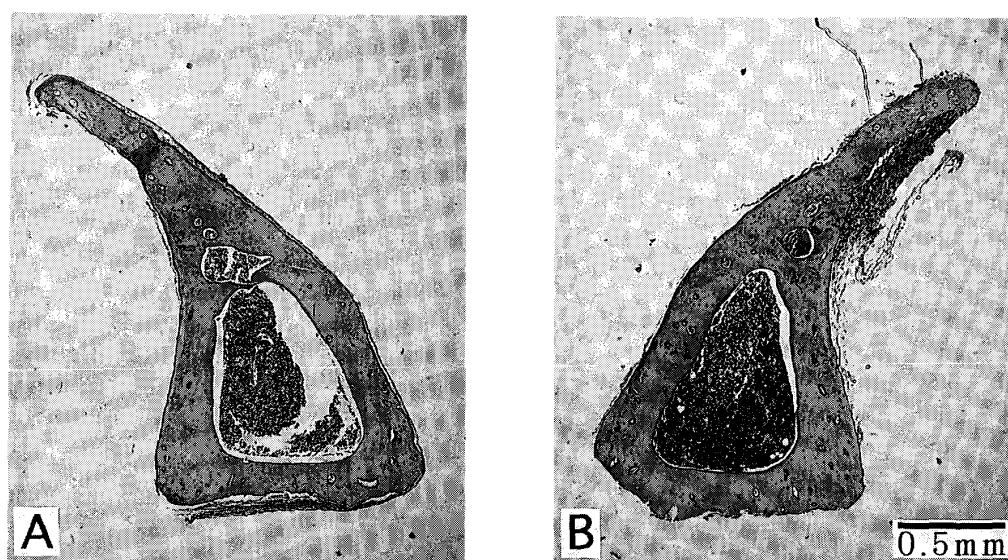


図6 移植後1週間の脛骨横断標本

A: アクチビンA投与骨(2 ng/hr)

B: 対照骨

アクチビンA投与骨、対照骨共に明瞭な骨組織の形成はみられない。骨髓腔内は壊死後の骨髓残渣と疎になったリンパ球が少量の赤血球と共に認められる。(×40, H. E. 染色)

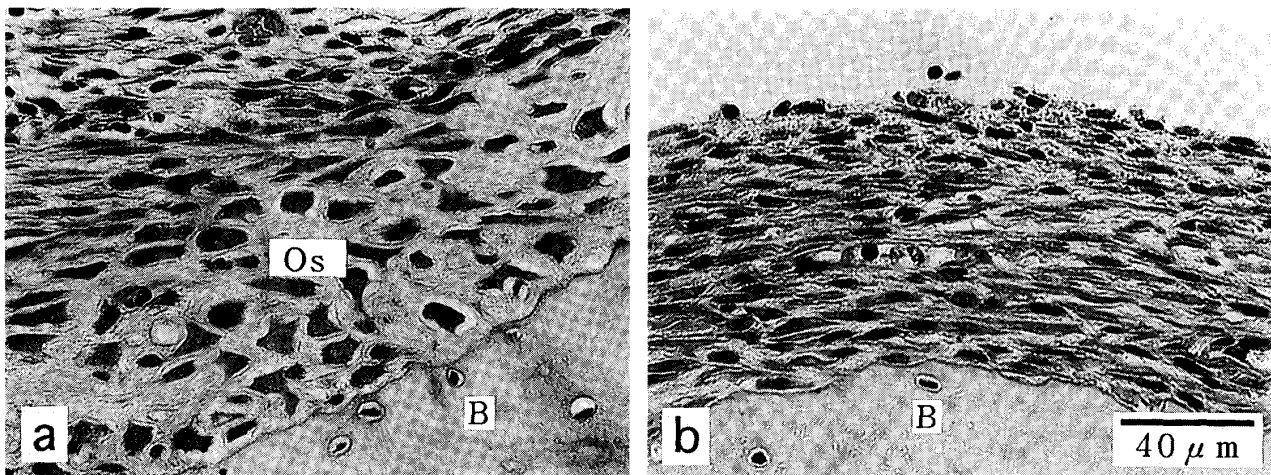


図7 移植後1週間の脛骨の外骨膜側の拡大写真像

a: アクチビン A 投与骨 (2 ng/hr)

b: 対照骨

アクチビン A 投与骨の外骨膜側には、外側を未分化な間葉系細胞で密に覆われた類骨の形成がみられ、内側に移行するにつれて骨芽細胞への分化の途上と思われる不規則な立法形の細胞が多くみられる。対照骨の外骨膜側には、密に配列した線維芽細胞を主体とした膜様組織はみられるが、骨様組織の形成はみられない。(×640)

B: 既存の皮質骨

Os: 類骨 (Osteoid) H. E. 染色

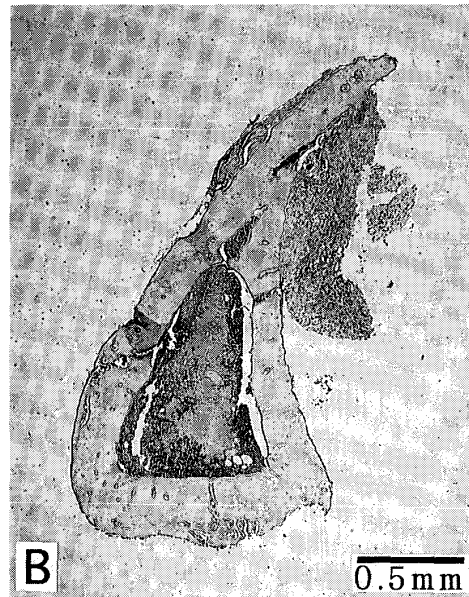
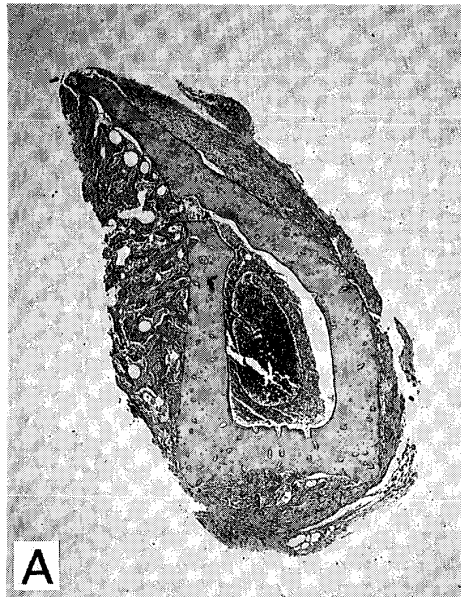


図8 移植後2週間の脛骨横断標本

A: アクチビン A 投与骨 (2 ng/hr)

B: 対照骨

アクチビン A 投与骨では対照骨と比較して外側面と後面における線維性骨の著明な形成が認められる。骨髓腔内にはアクチビン A 投与骨、対照骨ともに骨組織の新生はみられない。(×40, H. E. 染色)

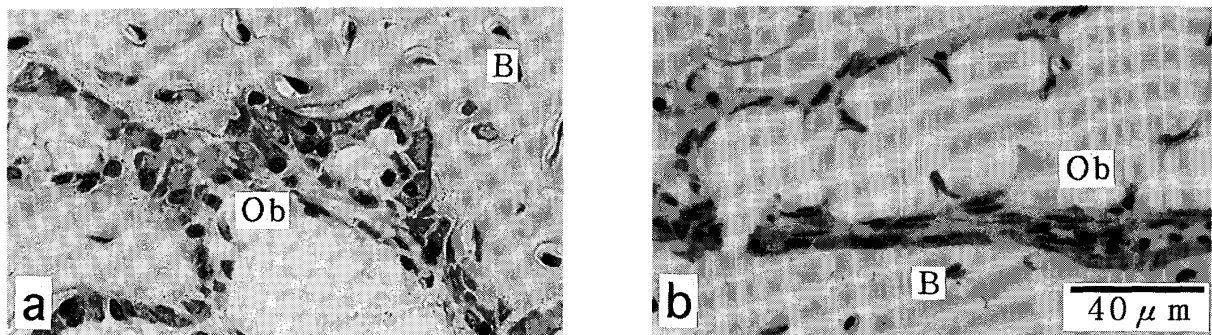


図9 移植後3週間の脛骨の外骨膜側の拡大写真像

a: アクチビン A 投与骨 (2 ng/hr)

b: 対照骨

アクチビン A 投与骨の新生骨の表面には対照骨と比較して単層に配列した立方形、円錐形の骨芽細胞が豊富に存在し、中には円柱状を呈し、多重に配列した骨芽細胞もみうけられる。(×640)

B: 骨 Ob: 骨芽細胞 H. E. 染色

と思われる網状の線維性骨の外縁には、豊富な間葉系組織がみられた。改造が進み、こうした線維性骨が次第に既存の皮質骨と似た緻密骨に変わってきたと思われる部位の周囲には、このような間葉系組織はみられなくなっていた。また、改造機転の働いている骨組織中には血管の形成や赤血球がしばしばみうけられた。

3週間のアクチビン A 投与骨の外骨膜側における所見は2週間のアクチビン A 投与骨の所見と類似していたが、添加された線維性骨の表面には単層に配列した立方形や円錐形の骨芽細胞の他、円柱状を呈して多重に配列した骨芽細胞がより多く認められ、2週間投与骨に較べて破骨細胞の数も増加し、全体に添加骨の改造がより進んでいることが推測された (図9)。

一方、2, 3週目の対照骨においても外骨膜側への骨添加が外側面や内側面、後面にわずかにみうけられ、その程度は3週目の方がやや高いと考えられた。しかし2, 3週目ともに活発な基質合成を行っていると思われる立方形の骨芽細胞や、盛んに骨を吸収していると思われる破骨細胞はアクチビン A 投与骨に較べて明らかに少なかった。

投与期間が2週間の脛骨の骨髓腔内での新生骨の形成及び破骨細胞の出現は、アクチビン A 投与骨、対照骨ともにほとんどみられなかった。一方、投与期間が3週間のアクチビン A 投与骨の骨髓腔内には間葉系組織とともに少量の新生骨の形成が認められ、新生骨組織表面には立方形や円錐形の骨芽細胞が破骨細胞とともにみうけられた。これに対して、3週目の対照骨の

骨髓腔内には、新生骨の形成はほとんどみられず、破骨細胞の数もアクチビン A 投与骨に較べて少なかった。

アクチビン A を 0.02 ng/hr, 0.2 ng/hr の用量で投与した移植骨は、それぞれの対照骨と比較して、特にみるべき違いを示さなかった。

4週間投与

アクチビン A 投与骨 (2 ng/hr) の外骨膜側では対照骨と比較して、外側面と後面での骨添加が著明で、2週間投与時点で見られた網状の線維性骨の大部分は、既存の骨と類似した緻密な皮質骨様組織へと変わっていた。また添加骨の外側に豊富に存在していた間葉系組織は2週目のアクチビン A 投与骨に較べて減少していた (図10)。添加された骨の表面には単層状に配列した立方形、円錐形の骨芽細胞がみられ、部位により重層した円柱状の骨芽細胞もしばしばみうけられた。しかし休止期の扁平な骨芽細胞が多くみられる部位や標本もあり、骨芽細胞の状態は様々であった。対照骨の表面においてもわずかに骨の添加が起きている像もみられたが、添加骨表面の骨芽細胞はアクチビン A 投与骨と較べて全体的に小型化、扁平化したものが多く、休止期の扁平な細胞が多数を占めていた。また対照骨と較べてアクチビン A 投与骨の外骨膜側面上には大型の破骨細胞が多くみうけられた (図11)。

骨髓腔内においては、アクチビン A 投与骨では間葉系組織とともに新生骨の形成が認められ、新生骨組織の表面には立方形や円錐形、円柱状の重なり合った骨芽細胞が破骨細胞とともに多くみられ、活発な骨形成

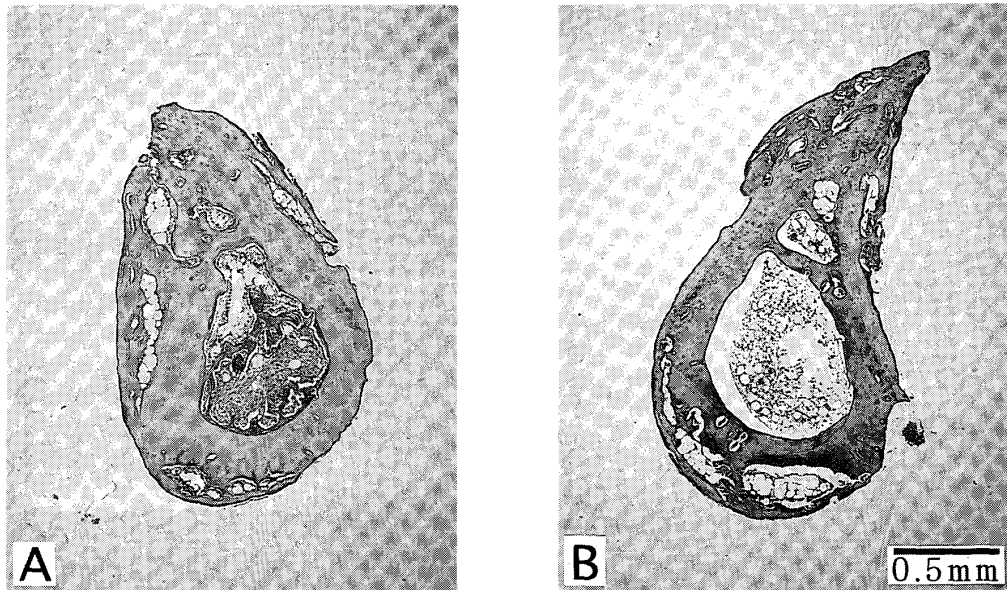


図 10 移植後 4 週間の脛骨横断標本

A: アクチビン A 投与骨 (2 ng/hr)

B: 対照骨

アクチビン A 投与骨の外骨膜側では線維性骨が皮質骨様の緻密骨に置きかわり、既存の皮質骨と癒合している。脛骨前縁部で骨が吸収され、前後径が短く、内外側方向に幅が広い、丸みを帯びた骨になっている。骨髓腔内には対照骨にはみられない新生骨の形成がみられる。(×40, H. E. 染色)

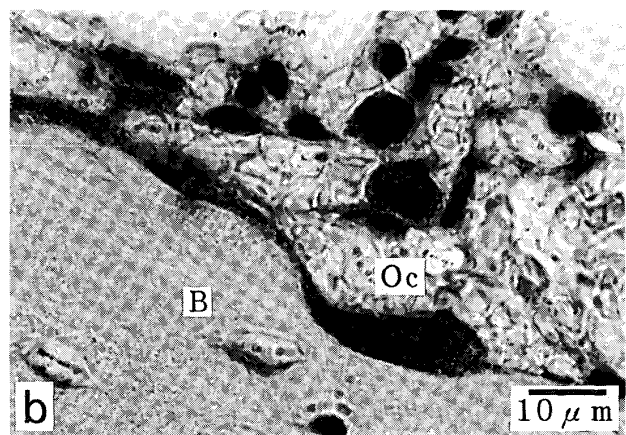
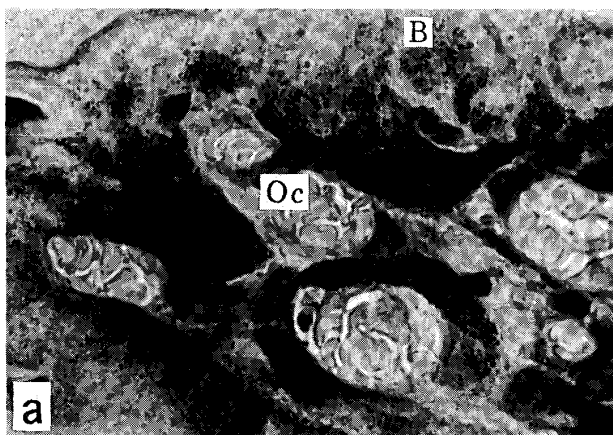


図 11 移植後 4 週間の脛骨の外骨膜側の拡大写真像

a: アクチビン A 投与骨 (2ng/hr)

b: 対照骨

対照骨と比較してアクチビン A 投与骨の外骨膜側には、大型の破骨細胞が多く出現している。(×1600)

B: 骨 Oc: 破骨細胞

TRACP 染色にヘマトキシリン染色を併用

が行われていることを推測させた(図 12)。これに対して対照骨の骨髓腔内は、赤血球やリンパ球様の細胞で占められたものや脂肪髄様の組織で占められたものなど様々であり、新生骨の形成はほとんどみられなかった。また対照骨と較べてアクチビン A 投与骨の骨髓腔

内には、大型の破骨細胞が多く出現していた。

これらの違いに加えてアクチビン A を投与した骨でみられた明瞭な現象の一つに脛骨前縁部の著明な吸収があった。横断像でみると移植前の脛骨の前縁部は彎曲した長三角形型の突起状を示しているが、アクチ

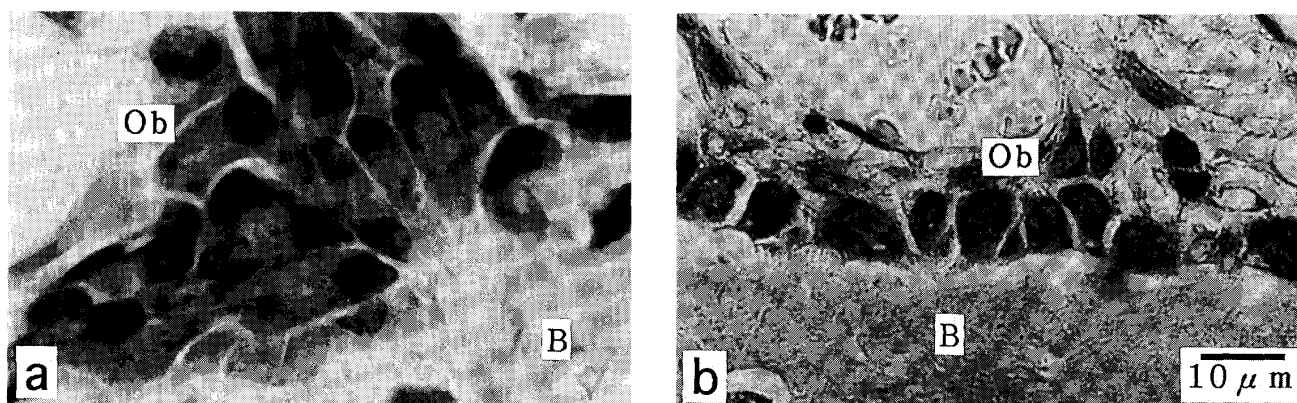


図12 移植後4週間の脛骨の骨髓腔内の拡大写真像

a: アクチビン A 投与骨 (2 ng/hr)

b: 対照骨

アクチビン A 投与骨の骨髓腔内には新たに添加された骨の表層に、多重に配列した円柱状の骨芽細胞がみられる。対照骨の骨髓腔内にはこのような骨芽細胞や骨組織はみられない。(×1600)

B: 骨 Ob: 骨芽細胞 H. E. 染色

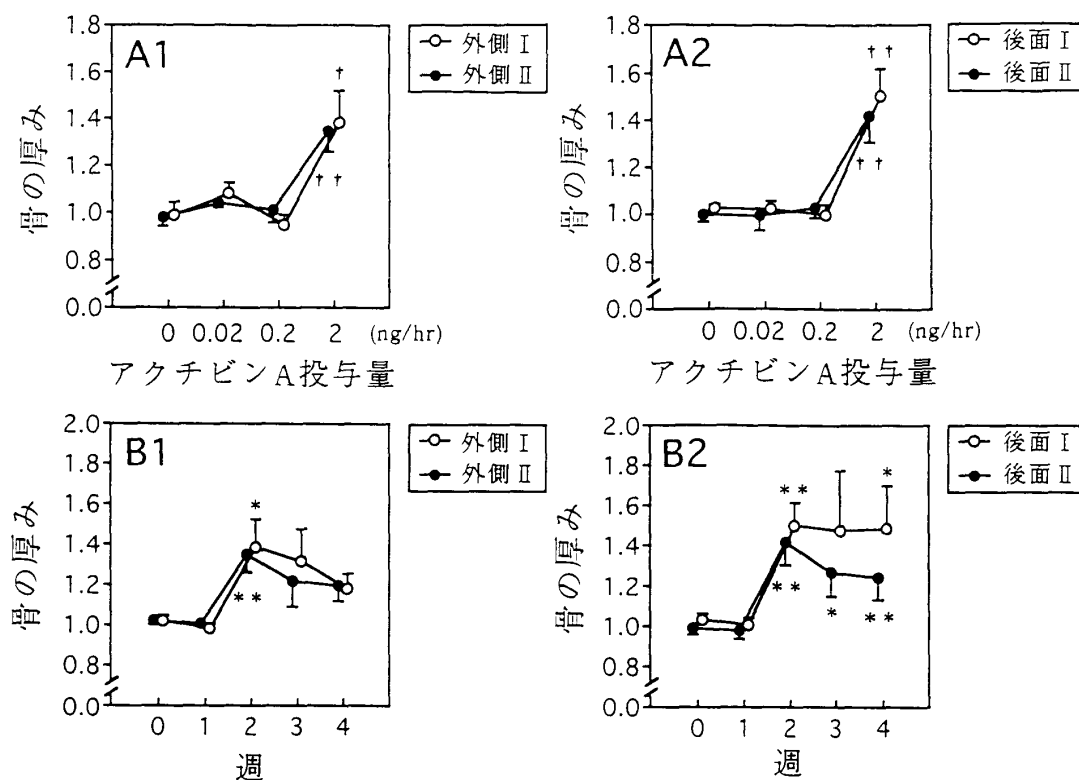


図13 アクチビン A 投与による骨の厚み(対照骨の厚さに対する比)の変化

A1, A2: アクチビン A を4つの用量で2週間投与した移植骨 (n=6-8)

B1, B2: アクチビン A (2 ng/hr) を0から4週間投与した移植骨 (n=5-9)

外側I・II, 後面I・IIについては, 図3を参照。測定値は平均値±標準誤差を示す(いずれも Kruskal-Wallis test に Mann-Whitney test を併用)。

†: $P<0.05$, ††: $P<0.01$ vs 0 ng/hr

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ vs 0週

ビン A 投与骨ではこの部位の先端部が吸収されて失われている像がみられ(7 例中 5 例, 図 10), このような骨では, 骨添加が外側面に著明に起こっていることとも相まって, 対照骨と比べ, 全体的に内外側方向に幅の広い, 丸みを帯びた形になっていた。しかし対照骨ではこのような前縁部での吸収はほとんど認められなかった(7 例中 0 例)。

3. 添加骨量の測定

アクチビン A を 0.02 ng/hr, あるいは 0.2 ng/hr の用量で 2 週間投与した骨の厚みは, 後面 I・II, 外側 I・II (図 3) のいずれの部位に関しても対照骨と比べて有意の差を示さなかった。これらに対して, アクチビン A を 2ng/hr の用量で 2 週間投与した骨の厚みは, 後面 I において対照骨のおよそ 1.5 倍, 外側 I・II, 後面 II においてはおよそ 1.4 倍の値を示し, これらの値はいずれも統計学的に有意であった(図 13A, Mann-Whit-

ney test, 外側 I: $P < 0.01$, 外側 II: $P < 0.05$, 後面 I: $P < 0.05$, 後面 II: $P < 0.05$)。

アクチビン A, 2ng/hr 投与群について経時的に骨の厚みの増加を観察すると, 移植後 1 週目では対照骨との間に有意の差が認められなかったものの, 2 週目になるとその値はどの測定部位においても移植後最大となった(図 13B)。移植後 3 週目, 4 週目になると, 対照骨にも僅かながら新生骨の添加が認められるため, 対照骨に対する比をみると, その値はほぼ横ばい, ないしはやや低下する傾向を示した。

4. 破骨細胞数の計数

アクチビン A, 2 週間の投与は, 外骨膜側の骨表面に存在する破骨細胞数を用量依存的に増加させる傾向を示したが, 統計的には 2ng/hr の投与によってはじめて有意の差を示した(図 14A, Two factor factorial

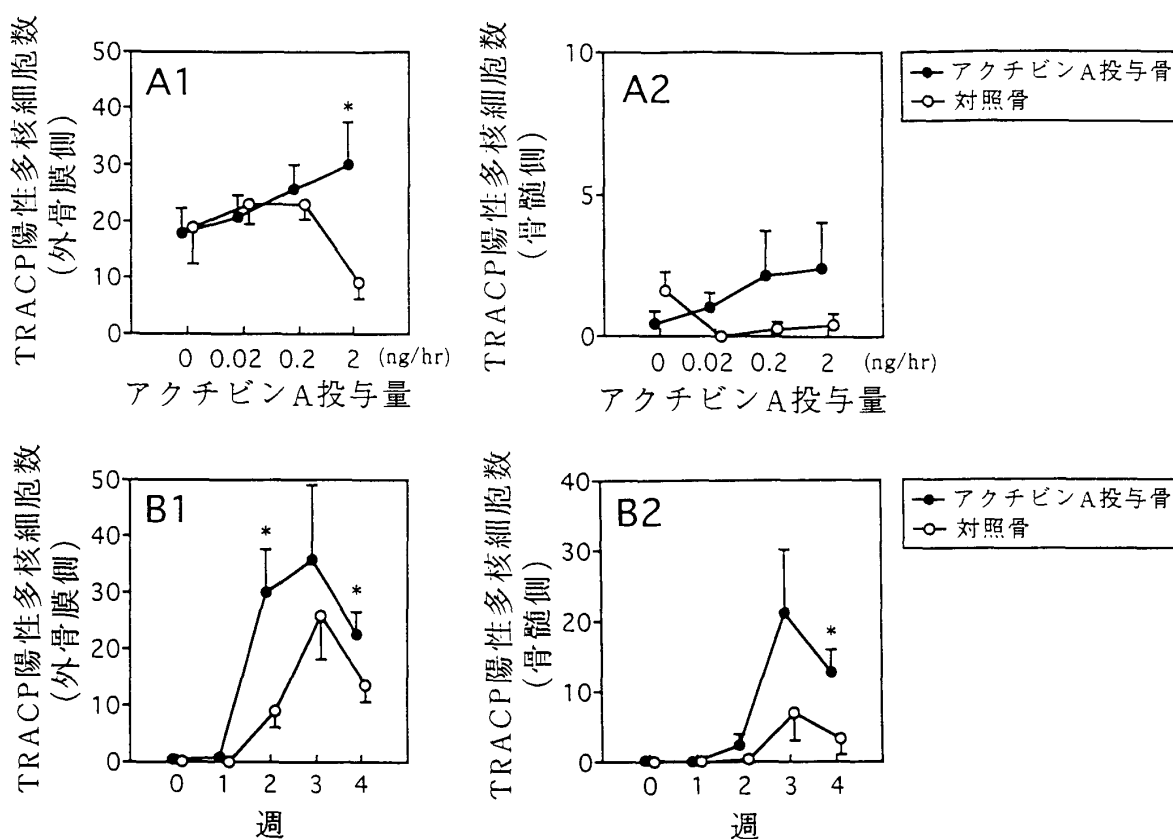


図 14 外骨膜上および骨髓腔内における TRACP 陽性細胞数

A1, A2: アクチビン A を 4 つの用量で 2 週間投与した移植骨 (n=5-8)

B1, B2: アクチビン A (2 ng/hr) を 0 から 4 週間投与した移植骨 (n=5-9)

測定値は平均値±標準誤差。

*: $P < 0.05$, アクチビン A 投与骨 vs 対照骨 (Two factor factorial ANOVA により交互作用がないことを確認した後, 対応のある t 検定を併用。)

ANOVA に対応のある t 検定を併用, $P < 0.05$)。骨髓腔内の破骨細胞数についても同様の傾向を示したが, もともと骨髓腔内には破骨細胞がほとんど存在せず, 統計学的にはどのアクチビン A 投与群についても対照群との間に差はなかった。

アクチビン A, 2 ng/hr 投与群について経時的な破骨細胞数の増加をみたのが図 14B である。外骨膜側の骨表面上に存在する破骨細胞数は, アクチビン A 投与骨, 対照骨とも 3 週間の投与で最大となった。しかし, アクチビン A 投与群では, この上昇が対照群に較べて有意に高かった (Two factor factorial ANOVA, $P < 0.05$)。4 週後では破骨細胞数はアクチビン A 投与群, 対照群とも減少に転じた。この傾向は骨髓腔内の破骨細胞数についてもほぼ同じであった。

5. オートラジオグラフによる骨基質中 ^3H -プロリンの測定

図 15 は, 2 ng/hr の用量のアクチビン A を 3 週間投与した移植骨および対照骨の骨基質上にみられた ^3H -プロリンによる銀粒子の分布を示したものである。 ^3H -プロリンによる銀粒子はアクチビン A 投与骨ないし対照骨とも立方形ないし円錐状の骨芽細胞下に数多く密にみられ, 一般に扁平な骨芽細胞の下にはその数が少なかった。アクチビン A 投与骨では, 骨表層に立方形ないし円錐状の骨芽細胞が存在する場所が多くみられ, そのために骨基質中に銀粒子が密に集積する部位が対照骨と較べて多くみられた。これらの銀粒子を, 骨芽細胞下の骨基質の単位面積 ($720 \mu\text{m}^2$) 中の数として測定した結果が図 16 である。各標本ごとに銀粒

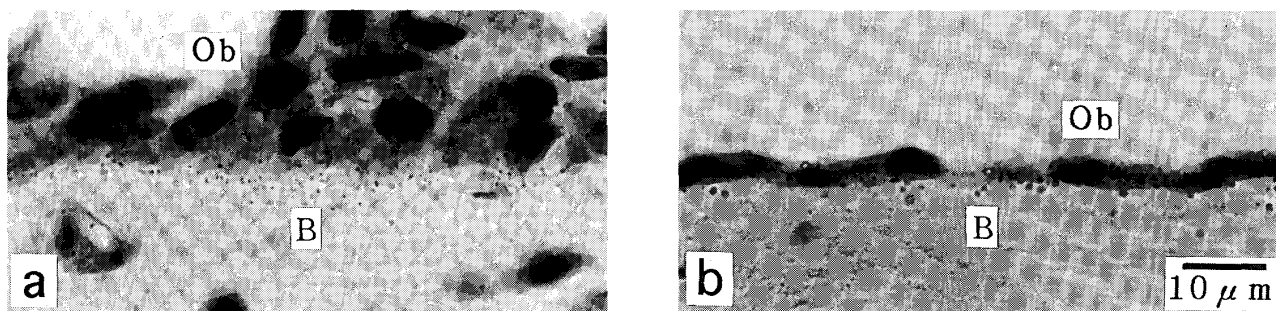


図 15 骨芽細胞下の ^3H -プロリンによる感光銀粒子

a: アクチビン A 投与骨 (2 ng/hr, 3 週間)

b: 対照骨 (0.9% NaCl, 3 週間)

アクチビン A 投与骨では対照骨に比べて骨芽細胞下の ^3H -プロリン感光銀粒子が豊富で, 骨芽細胞によるコラーゲン性基質合成・分泌が活発であることを示している。 ($\times 1600$)

B: 骨 Ob: 骨芽細胞 H. E. 染色

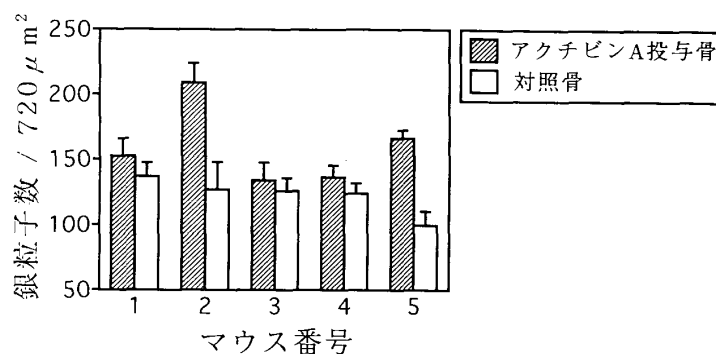


図 16 オートラジオグラフ上で計測された骨基質中の銀粒子数

アクチビン A (2 ng/hr) を 3 週間持続投与し, 屠殺する 1 時間前に ^3H -プロリンを腹腔内投与したマウス (5 匹) から得た移植骨横断標本のオートラジオグラフについて, 骨芽細胞下骨基質の単位面積中に存在する感光銀粒子数を各標本中上位 8ヶ所を選定し, 計測した。測定値は各標本ごとに測定した 8 領域の平均値 \pm 標準誤差を示す。アクチビン A 投与骨では対照骨に較べて銀粒子数が有意に高い値を示した (Two factor factorial ANOVA, $P < 0.001$)。

子の密度が最も高かった 8ヶ所を選んで測定した結果を示してある。アクチビン A 投与骨では対照骨に較べて銀粒子数が有意に高い値を示した (Two factor factorial ANOVA, $P < 0.001$)。また各標本ごとに得られた 8ヶ所の中の最高値のみについて比較すると、測定したペアのすべてについて、アクチビン A 投与骨の値が対照骨の値を上回った。

また、銀粒子数を測定した上記の骨標本について、測定した平均銀粒子数と骨の厚み (結果 4. 参照) との相関関係を調べた (図 17)。その結果、脛骨外側における骨の厚み (図 3, 外側 I・II) と感光銀粒子数の間には、有意の相関は認められなかったものの (γ : 0.469 および 0.427, Fisher の z 検定, 外側 I: $P > 0.18$, 外側 II:

$P > 0.23$), 脛骨後面における骨の厚み (図 3, 後面 I・II) と感光銀粒子数の間には、それぞれ強い相関関係 (γ : 0.859 および 0.937, Fisher の z 検定, 後面 I: $P < 0.001$, 後面 II: $P < 0.0001$) が認められた。

考 察

1. アクチビン A が骨形成に与える影響について

アクチビン A が骨基質中に多量に存在することが報告¹³⁾されて以来、骨代謝に果たすこの因子の役割に大きな関心が持たれている。しかし、アクチビン A が骨の形成や吸収機構に及ぼす影響について直接 *in vivo* で調べた研究はこれまでわずか数編にすぎない。

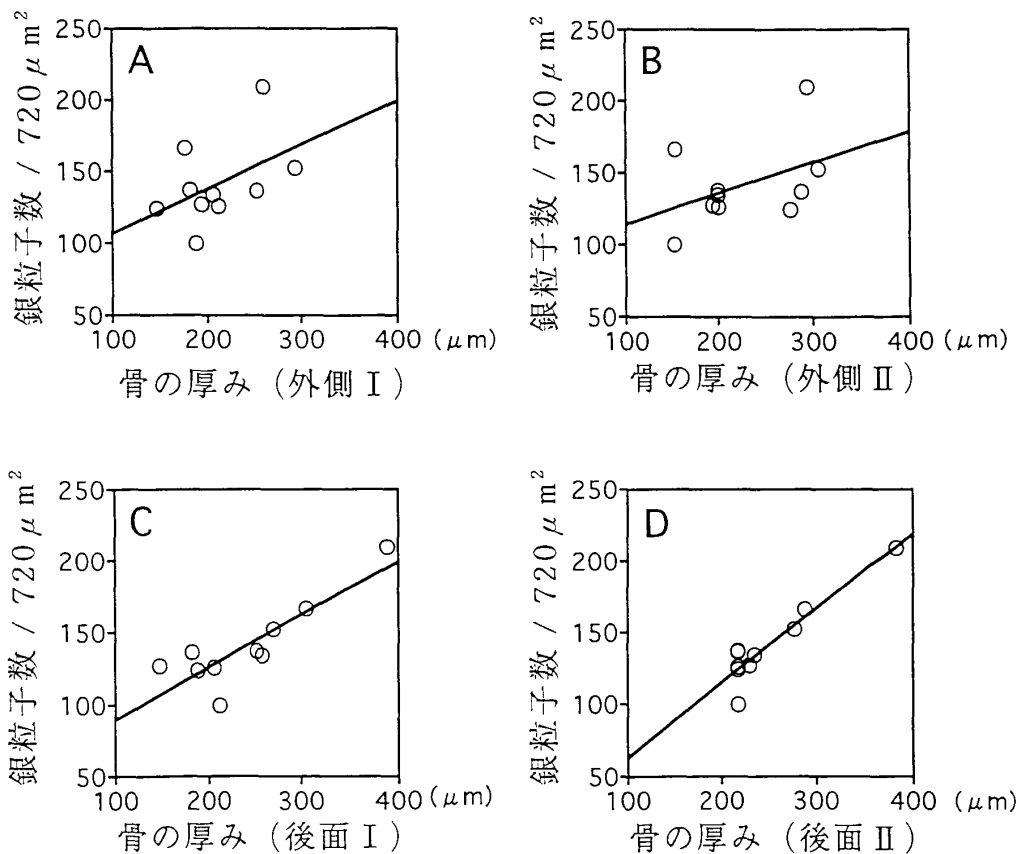


図 17 アクチビン A 投与後 3 週間の移植骨について得られた骨の厚みとオートラジオグラフ上で計測された骨基質中銀粒子数の相関関係

A: 外側 I における骨の厚みと骨基質中銀粒子数の相関

B: 外側 II における骨の厚みと骨基質中銀粒子数の相関

C: 後面 I における骨の厚みと骨基質中銀粒子数の相関

D: 後面 II における骨の厚みと骨基質中銀粒子数の相関

外側 I・II, 後面 I・II については、図 3 を参照。脛骨外側の骨の厚みと銀粒子数の間 (A, B) には、有意の相関は認められなかったものの (γ : 0.469 および 0.427, Fisher の z 検定, 外側 I: $P > 0.18$, 外側 II: $P > 0.23$), 脛骨後面の骨の厚みと感光銀粒子数の間 (C, D) には、それぞれ強い相関関係 (γ : 0.859 および 0.937, Fisher の z 検定, 後面 I: $P < 0.001$, 後面 II: $P < 0.0001$) が認められた。

Oue ら²⁶⁾ はアクチビン A をラットの頭頂骨骨膜下へ連日投与した場合、骨膜細胞層や頭頂骨の厚みが増加したことから、骨膜へのアクチビン A の投与が骨形成を促す可能性があることを示している。また Ogawa ら¹³⁾ はアクチビン A には BMPs や TGF- β のように単独での骨誘導作用はないものの、それらの因子による骨形成を促進する作用があることを報告している。今回の研究において、アクチビン A の投与により 2 週間後には移植骨に顕著な骨添加が起こり、骨の厚みが増加することが示された。また、骨量の増加はアクチビン A 投与開始後 3 週後、4 週後においても維持されていた。これらのことから、移植骨へのアクチビン A の投与によって骨形成が促進されることが明確に示された。また、骨受容マウスの同一個体内に設定した対照移植骨については、このような骨添加がみられなかったことから、アクチビン A による今回の骨形成の促進は、アクチビン A が局所的に作用した結果であることも示された。

2. アクチビン A が骨芽細胞と破骨細胞に与える影響について

本研究における組織学的検索から、アクチビン A 投与後 1 週間で、形成された添加骨表層には、主として未分化間葉系細胞からなる膜様の間葉組織に接して、骨芽細胞への分化の途上にあると考えられる様々な立方形の細胞が多数出現している像がみられた。また、移植して 2 週目以降に形成された添加骨の外骨膜側においても、アクチビン A 投与骨では立方形、円錐形、円柱状の骨芽細胞が対照骨と較べて豊富に存在していることが観察された。Oue ら²⁶⁾ も、新生ラット頭頂骨骨膜下へのアクチビン A の連日投与によって頭頂骨骨膜における立方形の骨芽細胞が増加したと報告しており、本研究の結果と一致する。さらに今回行ったオートラジオグラフによる実験から、アクチビン A 投与骨では対照骨に較べて骨基質中に ³H-プロリンの銀粒子が高い密度で存在する領域がより多く観察された。この事実はアクチビン A 投与により活発に骨形成が行われている骨領域が増えたことを意味しており、また機能的にも高い基質合成・分泌能を持つ骨芽細胞が誘導されていることを意味している。このことは各標本ごとに 8 領域ずつで計測した骨基質上の銀粒子数の平均値と形成された骨の厚みとの間に高い相関がみられたこと (図 17) から明らかなである。これらの所見を総合すると、アクチビン A は少なくとも今回投与した

用量においては、骨芽細胞の分化に対して促進的に働いていることは確かと思われる。また、組織学的にもアクチビン A 投与骨では骨芽細胞で覆われている骨表面が対照骨と較べて多いとみられることから、おそらく骨芽細胞の増殖に対しても促進的に働いている可能性がある。Centrella ら²³⁾ は、アクチビン A が osteoblast enriched culture において、DNA 合成やコラーゲン合成を促進したと報告しており、Hashimoto ら²⁴⁾ は、骨芽細胞系である MC3T3-E1 細胞を用いた培養系で、アクチビン A がこの細胞の DNA 合成を促進したことを報告している。これらの事実は、アクチビン A が骨芽細胞の増殖・分化の両過程に促進的に働く可能性を示唆している。

アクチビン A の破骨細胞への作用としては、破骨細胞の起源と考えられている単球系の細胞の分化を、*in vitro* で促進するとの報告¹⁷⁾ や、破骨細胞の骨吸収能は促進しないが形成を促進するとの報告²⁵⁾ があり、破骨細胞の分化の初期の段階でのアクチビン A の関与が指摘されている。今回の研究で、外骨膜側においては移植後 2 週目以降、また骨髓腔内においては移植後 4 週目において、アクチビン A 投与骨の破骨細胞数が対照骨のものより多く出現したことは、アクチビン A によって移植骨組織における破骨細胞の形成が促進されたことを示すものと思われ、上述の考えを支持している。また、アクチビン A を投与して 4 週目の移植骨において、横断組織像上で骨前縁部が吸収されて対照骨に較べて丸みを帯びていたことや、軟 X 線写真上で長軸的中心から近心にかけての骨前縁部が吸収されて、対照骨よりも前後径が短くなる所見がみられたことは、アクチビン A 投与によって移植骨の改変 (modeling) が進んだことを示しており、アクチビン A が骨芽細胞の分化・増殖のみでなく、骨吸収においても促進的に関与することが示唆された。また、TRACP 陽性の破骨細胞の出現は、骨添加が明瞭となる 2 週目以降にみられ、組織学的に骨添加が確認される 1 週目の移植骨においては対照骨にみられる以上の破骨細胞の出現はみられなかった。この事実はアクチビン A の一次作用 (primary action) が破骨細胞よりもむしろ骨芽細胞の分化・誘導にあることを意味しているのかもしれない。しかし、この点についての詳細は不明である。

また、アクチビン A が骨芽細胞と破骨細胞間の相互作用を増強することも考えられる。Takahashi ら²⁸⁾ や Felix ら²⁹⁾ は、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化

には骨芽細胞の関与が重要であると述べている。骨芽細胞の産生する macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) は、破骨細胞前駆細胞の増殖・分化において重要であるとされ^{30,31)}、分化した破骨細胞に対して化学走性や生存にとって重要な働きを持つ^{32,33)}ことが示されている。アクチビン A が骨芽細胞の前駆細胞や骨芽細胞に対して増殖・分化促進的に働くことでこれらの細胞の産生する破骨細胞の活性化因子が増強され、間接的に破骨細胞前駆細胞や破骨細胞に対して増殖・分化促進的に働いていたことは十分予想される。

アクチビン A は移植骨において BMPs^{34,35)} や TGF- β ³⁶⁾ など、他の骨芽細胞増殖・分化因子の作用を増強している可能性もある。Ogawa ら¹³⁾ は、アクチビン A のみをペレット状にしてラットの胸部に投与した場合には骨形成は認められず、アクチビン A と BMP を混合して投与した場合には、BMP 単独で投与した場合よりも多量の線維性骨の形成が認められたと報告し、アクチビン A と BMPs などの局所因子間には骨形成に関して協力作用が存在することを示唆している。今回の研究ではアクチビン A 投与によって破骨細胞の形成が進んだり、骨芽細胞などから放出される破骨細胞の活性化因子が増強されることによって骨吸収が進み、移植骨中に豊富に存在する BMPs や TGF- β などの局所因子が遊離することで、間接的に骨芽細胞に対してさらに増殖・分化促進的に働いていたことも考えられる。

このようにアクチビン A が骨芽細胞、破骨細胞に対して直接あるいは間接的に働くことで、移植骨内では

骨形成系及び骨吸収系がともに亢進した状態、即ち、高回転型の骨代謝が惹起されていたことが推測される。

3. 臨床的意義

アクチビンが移植骨の骨形成を促進するという作用のメカニズムを明らかにすることにより、これを臨床的に利用できる可能性がある。本研究で推測されたように移植骨組織における骨代謝を高回転型へ誘導する作用をアクチビンが持つならば、移植骨の迅速かつ安定した生着を目的にアクチビンを投与することが可能となるであろう。そのためには今後、アクチビン投与が全身に与える影響の検討をはじめとして、移植骨部で徐放的に投与するための担体の研究や、BMPs, TGF- β といった他の局所因子との複合投与などの様々な問題について、更に検討を加える必要があると思われる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御教示と御指導を頂きました東北大学歯学部歯科薬理学講座篠田壽教授、御指導を頂きました手島貞一東北大学名誉教授、御校閲を賜りました東北大学歯学部口腔外科学第二講座鹿沼晶夫教授、同口腔解剖学第二講座加賀山学教授に謹んで感謝の意を表します。また、終始様々な御協力と御援助を頂きました口腔外科学第二講座および歯科薬理学講座の皆様にあわせて厚く感謝いたします。

内容要旨：アクチビン A は TGF- β スーパーファミリーに属し、TGF- β や BMP 同様、骨基質中に豊富に存在するが、骨代謝におけるその生理的役割は不明である。本研究では、近交系マウスの背部皮下に移植した脛骨に持続的にアクチビン A を局所投与し、アクチビン A が移植骨の骨形成に対して促進的に働く可能性について検討した。その結果、1) アクチビン A 局所投与 (2 ng/hr) により、移植後 2, 3 週で外骨膜側に著明な骨形成がみられ、その皮質骨の厚みは部位によって対照骨の 1.4~1.5 倍の値を示した。また、4 週目には骨髓腔内においても新生骨の形成が認められた。2) アクチビン A 投与骨では移植後 1 週目より、骨芽細胞への分化の途上と思われる間葉系細胞が外骨膜側に多数みられた。さらに 2, 3 週目になると、その骨表層には立方形、円錐形を示す骨芽細胞が豊富にみられた。3) ³H-プロリンを用いたオートラジオグラフの観察から、アクチビン A 投与骨では骨芽細胞によるコラーゲン性基質合成・分泌が促進していることが示された。4) アクチビン A 投与骨では移植後 2 週目以降、破骨細胞数が対照骨に較べて増加した。また、4 週目には移植骨のモデリングの亢進を示唆する著明な骨吸収像が脛骨前縁部に認められた。以上の結果から、アクチビン A は、骨形成と骨吸収が共に上昇した高回転型の骨代謝を引き起こし、その結果、移植骨の骨形成を促進することが示された。

文 献

- 1) 柴田寛一：骨移植. 岐歯学誌 **6**：1-7, 1978.
- 2) Boyne, P.J. and Sands, N.R. : Secondary bone grafting of residual alveolar and palatal clefts. *J. Oral Surgery* **30** : 87-92, 1972.
- 3) Boyne, P.J. and Sands, N.R. : Combined orthodontic-surgical management of residual palato-alveolar cleft defects. *Am. J. Orthod.* **70** : 20-37, 1976.
- 4) 幸地省子, 東福寺長道, 松井桂子, 仲島宏敏, 高橋哲, 手島貞一：顎裂への新鮮自家腸骨海綿骨細片移植－歯槽頂の高さの評価. 日口外誌 **39** : 735-741, 1993.
- 5) 幸地省子, 松井桂子, 飯野光喜, 高橋 哲, 玉木祐介, 森川秀広, 福田雅幸, 君塚 哲, 熊谷正浩, 斉藤哲夫, 猪狩俊郎, 山口 泰, 越後成志, 手島貞一：顎裂への新鮮自家腸骨海綿骨細片移植－歯槽頂の幅の評価. 日口外誌 **39** : 972-983, 1993.
- 6) 飯野光喜, 幸地省子, 松井桂子, 玉木祐介, 高橋哲, 山口 泰, 越後成志, 手島貞一：顎裂部に対する自家腸骨海綿骨細片移植術－X線CTによる骨架橋の評価. 日口蓋誌 **19** : 22-31, 1994.
- 7) Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D. and Spiess, J. : Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* **321** : 776-779, 1986.
- 8) Ling, N., Ying, S.-Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M. and Guillemin, R. : Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* **321** : 779-782, 1986.
- 9) Urist, M.R. : Bone: Formation by autoinduction. *Science* **150** : 893-899, 1965.
- 10) Urist, M.R. and Strates, B.S. : Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* **50** : 1392-1406, 1971.
- 11) Centrella, M. and Canalis, E. : Transforming and nontransforming growth factors are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82** : 7335-7339, 1985.
- 12) Seyedin, S.M., Thompson, A.Y., Bentz, H., Rosen, D.M., McPherson, J.M., Conti, A., Siegel, N.R., Galluppi, G.R. and Piez, K.A. : Cartilage-inducing factor-A. *J. Biol. Chem.* **261** : 5693-5695, 1986.
- 13) Ogawa, Y., Schmidt, D.K., Nathan, R.M., Armstrong, R.M., Miller, K.L., Sawamura, S.J., Ziman, J.M., Erickson, K.L., De Leon, E.R., Rosen, D.M., Seyedin, S.M., Glaser, C.B., Chang, R.-J., Corrigan, A.Z. and Vale, W. : Bovine bone activin enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation. *J. Biol. Chem.* **267** : 14233-14237, 1992.
- 14) Eto, Y., Tuji, T., Takezawa, M., Takano, S., Yokogawa, Y. and Shibai, H. : Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142** : 1095-1103, 1987.
- 15) Murata, M., Eto, Y., Shibai, H., Sakai, M. and Muramatsu, M. : Erythroid differentiation factor is encoded by the same mRNA as that of the inhibin β A chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** : 2434-2438, 1988.
- 16) Meunier, H., Rivier, C., Evans, R.M. and Vale, W. : Gonadal and extragonadal expression of inhibin α , β A, and β B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** : 247-251, 1988.
- 17) Yamada, R., Suzuki, T., Hashimoto, M., Eto, Y., Shiokawa, K. and Muramatsu, M. : Induction of differentiation of the human promyelocytic cell line HL-60 by activin/EDF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187** : 79-85, 1992.
- 18) Schubert, D., Kimura, H., LaCorbiere, M., Vaughan, J., Karr, D. and Fischer, W.H. : Activin is a nerve cell survival molecule. *Nature* **344** : 868-870, 1990.
- 19) Schubert, D. and Kimura, H. : Substratum-growth factor collaborations are required for the mitogenic activities of activin and FGF on embryonal carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **114** : 841-846, 1991.
- 20) Asashima, M., Nakano, H., Shimada, K., Kinoshita, K., Ishii, K., Shibai, H. and Ueno, N. : Mesodermal induction in early amphibian embryos by activin A (erythroid differentiation factor). *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198** : 330-335,

- 1990.
- 21) Smith, J.C., Price, B.M.J., Nimmen, K.V. and Huylebroeck, D.: Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature* **345**: 729-731, 1990.
- 22) Van den Eijnden-Van Raaij, A.J.M., Van Zoelent, E.J.J., Van Nimmen, K., Koster, C.H., Snoek, G.T., Durston, A.J. and Huylebroeck, D.: Activin-like factor from a *Xenopus laevis* cell line responsible for mesoderm induction. *Nature* **345**: 732-734, 1990.
- 23) Centrella, M., McCarthy, T.L. and Canalis, E.: Activin-A binding and biochemical effects in osteoblast-enriched cultures from fetal-rat parietal bone. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 250-258, 1991.
- 24) Hashimoto, M., Shoda, A., Inoue, S., Yamada, R., Kondo, T., Sakurai, T., Ueno, N. and Muramatsu, M.: Functional regulation of osteoblastic cells by the interaction of activin-A with follistatin. *J. Biol. Chem.* **267**: 4999-5004, 1992.
- 25) Sakai, R., Eto, Y., Ohtsuka, M., Hirafuji, M. and Shinoda, H.: Activin enhances osteoclast-like cell formation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 39-46, 1993.
- 26) Oue, Y., Kanatani, H., Kiyoki, M., Eto, Y., Ogata, E. and Matsumoto, T.: Effect of local injection of activin A on bone formation in newborn rats. *Bone* **15**: 361-366, 1994.
- 27) Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Kodama, H., Martin, T.J. and Suda, T.: The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* **125**: 1805-1813, 1989.
- 28) Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J.M., Martin, T.J. and Suda, T.: Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123**: 2600-2602, 1988.
- 29) Felix, R., Cecchini, M.G. and Fleisch, H.: Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* **127**: 2592-2594, 1990.
- 30) Takahashi, N., Udagawa, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Shionome, M. and Suda, T.: Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *J. Bone Miner. Res.* **6**: 977-985, 1991.
- 31) Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Tamura, T., Akatsu, T., Stanley, E.R., Kurokawa, T. and Suda, T.: Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J. Clin. Invest.* **91**: 257-263, 1993.
- 32) Fuller, K., Owens, J.M., Jagger, C.J., Wilson, A., Moss, R. and Chambers, T.J.: Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J. Exp. Med.* **178**: 1733-1744, 1993.
- 33) Jimi, E., Shuto, T. and Koga, T.: Macrophage colony-stimulating factor and interleukin- 1α maintain the survival of osteoclast-like cells. *Endocrinology* **136**: 808-811, 1995.
- 34) Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Kahn, A.J., Suda, T. and Yoshiki, S.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J. Cell Biol.* **113**: 681-687, 1991.
- 35) Chen, T.L., Bates, R.L., Dudley, A., Hammonds, R.G., Jr. and Amento, E.P.: Bone morphogenetic protein-2b stimulation of growth and osteogenic phenotypes in rat osteoblast-like cells: Comparison with TGF- β 1. *J. Bone Miner. Res.* **6**: 1387-1393, 1991.
- 36) Centrella, M., McCarthy, T.L. and Canalis, E.: Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* **262**: 2869-2874, 1987.